

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 218—220, Mai 1970

Ein Verfahren zur Beurteilung konservierungs- und sterilisationsbedingter Kollagenschädigungen an homologen und heterologen Herzklappen- und Duratransplantaten

Von H. HAAS, F. W. HEHRLEIN und L. RÓKA¹⁾

Aus dem Institut für Klinische Chemie (Direktor: Professor Dr. L. Róka) und der Chirurgischen Universitätsklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Professor Dr. K. Voßschulte)

(Eingegangen am 29. November 1969)

Es wird über ein Verfahren berichtet, welches eine differenzierte Beurteilung konservierungsbedingter Kollagenschädigung an Aortenklappentransplantaten und Duratransplantaten ermöglicht. Durch Bestimmung des durch Trypsin-Andauung freigesetzten Hydroxyprolin der untersuchten Gewebe lassen sich deutlich unterschiedliche Transplantatschädigungen nachweisen.

A method for the determination of collagen damage caused by preservation and sterilisation in homologous and heterologous transplants of heart valves and dura

A method is reported for the differential assessment of collagen damage caused by preservation in aorta valve transplants and dura transplants. Markedly different degrees of transplant damage are revealed by measuring the hydroxyproline released by trypsin digestion of the tissue.

Die Verwendung autologen Gewebes in der Transplantationschirurgie ist mit dem Nachteil eines verlängerten operativen Eingriffes verbunden und nur dann möglich, wenn das entnommene Transplantat am Entnahmeort keine wesentliche funktionelle Störung hinterläßt. Kunststoffmaterialien genügen oft nicht den an sie gestellten Anforderungen bezüglich der Belastbarkeit auf lange Zeit und der Gewebeverträglichkeit. Aus diesem Grunde gewinnt die Anwendung homologer und heterologer Transplantate in verschiedenen Disziplinen der Chirurgie in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung. So hat sich vor allem im kardio-vaskulären Bereich der Ersatz der erkrankten Aorten- und Mitralklappe durch menschliche und tierische Aortenklappen-transplantate bewährt, und bildet heute einen Gegenpol zu dem sonst üblichen Herzklappenersatz durch künstliche Kugel- oder Linsen-Ventilprothesen (1—7).

In der Neurochirurgie stellt die Anwendung von vorgefertigter Fremddura zur Deckung großer Duradefekte eine wesentliche Bereicherung der operativen Behandlungsmöglichkeiten dar (8—10).

Diese homologen und heterologen Transplantate sind im wesentlichen zellfreies biologisches Material. Sie werden ohne Berücksichtigung einer Antigenität übertragen.

Um sie in ausreichender Menge für die notwendigen Eingriffe bereitstellen zu können, mußten Konservierungsverfahren entwickelt werden, die eine länger-dauernde Aufbewahrung der Transplantate in einer sog. „Gewebebank“ ermöglichen. Zusätzliche Sterilisationsmaßnahmen sind bei der meist unter unsterilen Bedingungen stattfindenden Transplantatgewinnung erforderlich.

Die Gefriertrocknung gilt seit ihrer Einführung in den klinischen Bereich durch FLOSDORF und MUDD (11) im Jahre 1935 als ein zuverlässiges Verfahren der Langzeitkonservierung für biologisches Gewebe. Unter den zur Verfügung stehenden Sterilisationsmitteln hat sich vor allem die Äthylenoxidbegasung (12) bewährt. Verbreitete Anwendung fanden ferner die Strahlensterilisation und β -Propiolacton-Behandlung (13, 14). Zur sterilen Feuchtkonservierung sind vor allem Lösungen von Quecksilberverbindungen geeignet (5).

Alle aufgeführten Konservierungs- und Sterilisationsverfahren rufen jedoch morphologisch faßbare, mehr oder minder starke Veränderungen am Gewebe hervor (15). Von besonderem klinischen Interesse erschien uns deshalb die Beurteilung einer evtl. konservierungsbedingten Wertminderung bei Herzklappen- und Duratransplantaten, denn Aortenklappen und Duren sind, wie bereits erwähnt, zur Transplantation besonders geeignet.

Im folgenden wird ein Verfahren beschrieben, das eine differenzierte Aussage über den Grad der Kollagenschädigung an diesen Geweben aufgrund der vorangegangenen Konservierungsprozesse ermöglicht. Wir gehen dabei davon aus, daß natives Kollagen durch Verdauungs-Proteasen kaum gespalten wird (16). Denaturiertes Kollagen verliert aber sein ursprüngliches molekulares Gefüge und wird für Trypsin leicht angreifbar. Wenn man voraussetzt, daß alle Konservierungs- und Sterilisationsverfahren mit einer unterschiedlich starken Denaturierung des biologischen Materials einhergehen, so muß aus der quantitativ unterschiedlichen Angreifbarkeit für Trypsin das Ausmaß der Schädigung durch die einzelnen Verfahren ablesbar sein.

¹⁾ Techn. Assistenz KAREN DROHMANN.

Methodik

Material

Kälberaorten, menschliche Dura.
 L-(—)-Hydroxyprolin (Merck 4506)
 Chloramin T (Merck 2426)
 4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck 3057)
 Perchlorsäure, 4M (durch Verdünnen aus HClO₄ 70 proz., Merck 519)
 Trypsin (Serva 37260)

Lösungen

Citrat-Acetat-Puffer pH 6

50 g Citronensäure · H₂O (Merck 244)
 120 g Na-Acetat · 3 H₂O (Merck 6495)
 34 g NaOH
 12 ml Eisessig ad 1000 ml redest. Wasser

Chloramin T-Lösung

2,82 g Chloramin T
 40 ml redest. Wasser
 60 ml Äthylenglycolmonomethyläther (Merck 858)
 100 ml Citrat-Acetat-Puffer

p-Dimethylaminobenzaldehyd

10 g in 100 ml Äthylenglycolmonomethyläther lösen
 1proz. β-Propiolacton Lösung in Wasser

Cialitlösung nach CARPENTIER

Stammlösung:
 24,2 g Trishydroxymethylaminomethan
 23,2 g Maleinsäure aufgefüllt auf 1000 ml redest. Wasser, welches vorher zur Entfernung des CO₂ zum Sieden gebracht worden ist.
 Eigentliche Konservierungslösung:
 250 ml Stammlösung
 240 ml 0,2N Natriumbicarbonat
 0,01 g 2-Äthylenmercurimercaptobenzoxazol-5-carbonsaures Natrium
 0,05 g Phenolrot
 ad 1000 ml redest. Wasser

Trypsin-Puffer pH 8

Zu 100 ml 1N Ameisensäure wird 1N Ammoniaklösung unter Rühren, bis pH 8 erreicht ist, zugesetzt. In 50 ml Puffer werden jeweils frisch 100 mg Trypsin gelöst.

Antibiotika-Heparin-Lösung

1 g Streptomycin und 10000 E Heparin in 1 l physiol. NaCl-Lösung.

Vorgehen

Je 20 Kälberaortenklappen wurden bis spätestens 6 Stdn. nach der Schlachtung der Tiere vom anhängenden Gewebe freipräpariert und zunächst für 12 Stdn. in einer NaCl-Streptomycin-Heparin-Lösung aufbewahrt, dann entweder nur lyophilisiert, oder einerseits vor der Gefriertrocknung 12 Stdn. mit Äthylenoxid begast oder 1 Std. in eine 1proz. β-Propiolacton-Lösung eingelegt oder andererseits nach der Gefriertrocknung mit einer Gesamtdosis von 2,5 Mrad gammastrahlensterilisiert.

Ein weiteres Segment haben wir für 4 Wochen in eine äquilibrierte Cialitlösung nach der Methode CARPENTER-AUDHOUX eingelegt.

Die so vorbehandelten Klappensegmente wurden gewogen, mit der Schere zerkleinert und unter leichtem Rühren mit 10 mg Trypsin in 5 ml Puffer pro Klappensegment 12 Stdn. bei 37° auf einem Magnetrührer zur Verdauung angesetzt.

Nach Abpipettieren des Überstandes und zweimaligem Waschen des Rückstandes wurde das Waschwasser zusammen mit dem Überstand auf 10 ml aufgefüllt. Getrennt wurden dann 2 ml des Überstandes und der gesamte Rückstand mit je 2 ml 25proz. Salzsäure in Ampullen eingeschmolzen und 20 Stdn. bei 110° im Brutschrank hydrolysiert.

Nach der Hydrolyse wurden die Ansätze mit Citrat-Acetat-Puffer versetzt und mit dem Titrator²⁾ auf pH 6 eingestellt. Die mit Cialit behandelten Proben mußten zur Beseitigung des Phenolrotindikators über eine kurze Amberlite Säule (Amberlite IRA 410, Serva, in Transfusionsschlauch, Durchmesser 3 mm, 100 mm Höhe) gegeben werden.

Der Hydroxyprolinegehalt wurde nach der Methode STEGEMANN bestimmt, die Extinktion des dabei entstehenden roten Farbstoffs mit dem Filter Hg 578 nm am Eppendorf-Fotometer³⁾ abgelesen.

Auswertung

Mit 20 mg L-(—)-Hydroxyprolin in 100 ml 0,001N HCl als Stammlösung wurde eine Eichkurve erstellt, die Extinktionen der Proben in mg abgelesen, entsprechend den Verdünnungen multipliziert und auf 1 g Klappeneinwage berechnet. Das Maß der Schädigung errechnet sich aus dem prozentualen Anteil des Hydroxyprolins im Überstand vom Gesamthydroxyprolin.

Tab. 1

Hydroxyprolinegehalt des Überstandes nach Trypsinierung, ausgedrückt in Prozent des Gesamthydroxyprolin des Klappensegmentes. Angegeben sind Mittelwerte und Streuung der sechs verschiedenen Gruppen sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit

	n	\bar{x}	$\pm s$	p
Nativ	20	38,73	6,45	—
Lyophilisiert	20	42,54	10,02	n. s.
β-Propiolacton und lyophilisiert	20	65,62	10,54	0,001
Lyophilisiert und 2,5 M rad	20	63,27	13,95	0,001
Äthylenoxid und lyophilisiert	20	17,20	7,45	0,001
Cialitkonservierung	20	10,60	5,54	0,001

Die Unabhängigkeit der Mittelwerte der einzelnen behandelten Gruppen haben wir mit der Einweg-Varianz-Analyse bestätigt:

Tab. 2

Einweg-Varianz-Analyse. Angegeben sind die Summe der Quadrate (SS) zwischen und innerhalb der Gruppen, die Zahl der Freiheitsgrade (df), die mittlere Summe der Quadrate ($MS = \frac{SS}{df}$) und $F = \frac{MS_{zw.}}{MS_{in.}}$.

*** Die Signifikanz ist sehr hoch

Quelle	SS	df	MS	F
zw.***	51768,169	4	12942,042	131,448***
inner.	9353,650	95	98,457	—
Total	61121,830	99	—	—

Die statistische Sicherung der Befunde der behandelten Klappensegmente gegenüber dem nativen Präparat erfolgte mit dem t-Test nach Student. Die partielle Abhängigkeit der Einzelgruppen, die durch die gleiche Bezugsgruppe gegeben ist, dürfte bei der sehr starken Signifikanz nicht ins Gewicht fallen.

Diskussion

Kollagenes Fasergewebe ist durch seinen Gehalt an Hydroxyprolin gewissermaßen biologisch markiert. Hydroxyprolin kommt im Organismus nur noch im Elastin in geringen Mengen vor.

Eine spezifische und relativ empfindliche Nachweismethode für Hydroxyprolin besteht in der Umwandlung der Aminosäure in Pyrrol durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung, mit nachfolgender Reaktion des Pyrrols mit p-Dimethylaminobenzaldehyd, wobei ein roter Farbstoff gebildet wird.

²⁾ Titrator und Autoburette Radiometer Copenhagen.

³⁾ Fa. Netheler und Hinz, Hamburg.

Von verschiedenen Autoren wurden auf dieser Grundlage Methoden zur Hydroxyprolin-Bestimmung angegeben (17–20). RAUSKOLB (20) hat das Verfahren von STEGEMANN, welches Hydroxyprolin durch Oxydation in leicht saurem Milieu nachweist, systematisch auf Störfaktoren untersucht, die von den an der Reaktion beteiligten Substanzen wirksam werden können. Bei seinen Untersuchungen an Sehnengewebe fand er, daß bei genauer Beachtung der Arbeitsanweisung die Fehlerbreite bei $\pm 5\%$ liegt. Sie ist vor allem durch die Inhomogenität des Materials bedingt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kälberaortenklappen untersucht, jeweils nativ und nach Einwirkung von fünf verschiedenen Konservierungs- bzw. Sterilisationsverfahren. Die Ergebnisse lassen zwei von den nativen Klappen als Bezugswert deutlich abweichende Gruppen erkennen. Die mit β -Propiolacton behandelten und die gammastrahlensterilisierten Klappen sind offensichtlich stärker als die Klappensegmente der übrigen Behandlungsgruppen geschädigt worden, da durch die Trypsinwirkung signifikant höhere Hydroxyprolinmengen in

den Überstand abgegeben wurden. Die Lyophilisation allein verursacht offensichtlich keinen zusätzlichen Schaden. Der relativ hohe Hydroxyprolingehalt im Überstand der nativen Klappen läßt allerdings vermuten, daß die Bearbeitung und Aufbewahrung der Klappensegmente ohne zusätzliche Behandlung doch das Gewebe bereits spürbar schädigt.

Die Sterilisation mit Äthylenoxid und die Cialitbehandlung scheinen das Herzklappengewebe nicht erheblich zu schädigen. Wir vermuten allerdings, daß der signifikant geringere Hydroxyprolinanteil des Überstandes bei der Äthylenoxidbehandlung zu einem Teil auf eine Vernetzung des Kollagens zurückzuführen ist, die die Trypsinwirkung verdeckt. Wir können nicht entscheiden, ob auch bei der Cialitwirkung eine chemische Modifikation die Trypsinwirkung behindert oder verdeckt.

An einer weiteren Untersuchung an menschlicher Dura soll untersucht werden, ob das geschilderte Verfahren allgemein geeignet ist, quantitativ unterschiedliche Schädigungen an kollagenem Fasergewebe anzuzeigen.

Literatur

1. ROSS, D., Brit. J. Surg. 64, 842 (1967).
2. BARRAT-BOYES, B. G., Thorax, London 19, 131 (1964).
3. BINET, J. P., A. CARPENTIER und J. LANGLOIS, Langenbeck's Arch. klin. Chir. 316, 800 (1966).
4. IONESCU, M. I., Y. S. MASSHOUR und G. H. WOOLER, Thorax, London 23, 221 (1968).
5. CARPENTIER, A., Traitment des lésions valvulaires aortiques par des greffes hétéroplastiques. R. Foulon et Cie Paris (1966).
6. BRAUNWALD, N. S. und DON E. DETMER, Progr. Cardiovas. Dis. 11, 113 (1968).
7. ANGELL, W. W., R. D. WUERFLEIN und N. E. SHUMWAY, Surgery, S. Louis 62, 807 (1967).
8. PIA, H. W., Mels. Med. Mitt. 41, 61 (1967).
9. WEBER, K. A. und F. KNIPPING, Zbl. Chir. 18, 682 (1966).
10. WEICKMANN, F. und H. J. STEINKE, Chirurgie, Lausanne 30, 320 (1959).
11. FLOSDORF, E. W. und S. MUDD, J. Immunol., Baltimore 29, 389 (1935).
12. COLLINS, H. A. und J. H. FORSTER, Amer. Surg. 20, 820 (1954).
13. MEEKER, I. A. und R. E. GROSS, Science (New York) 114, 283 (1951).
14. SZILAGYI, D. E., P. R. OVERHULSE, C. P. SHONNARD und G. A. LOGRIPPO, Surg. Forum 5, 244 (1954).
15. HEHRLEIN, F. W., W. SCHMITT und N. PAPASTAVROU, Thoraxchirurgie 17, 244 (1969).
16. RAPOPORT, S. M., Medizinische Biochemie, Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1962).
17. NEUMANN, R. E. und M. A. LOGAN, J. biol. Chemistry 184, 299 (1950).
18. PROCKOP, D. W. und S. UDENFRIEND, Analytic Biochem. 1, 228 (1960).
19. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 310, 41 (1958).
20. RAUSKOLB, R., Inaug. Diss. Gießen (1967).

Dr. med. Hans Haas und
Prof. Dr. med. L. Róka
Institut für Klinische Chemie
an den Universitätskliniken
63 Gießen, Klinikstr. 32b

Dr. med. F. W. Hehrlein
Chirurgische Universitätsklinik
63 Gießen, Klinikstr. 37



H. Pilz:

Die Lipide des normalen und pathologischen Liquor cerebrospinalis

Mit 4 Abbildungen und 23 Tabellen.
Etwa 135 Seiten. Erscheint April 1970.
(Schriftenreihe Neurologie/Neurology Series, Band 4)
DM 48,—; US \$ 13.20

Das Buch gibt eine umfassende Übersicht über Untersuchungsmethoden und -ergebnisse von Lipiden des Liquor cerebrospinalis und fügt kritische Betrachtungen über deren Herkunft an.

M. Arnold:

Histochemie

Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden

Mit 68 Abbildungen. 218 Seiten. 1968.
Gebunden DM 38,—; US \$ 10.50

Eine einprägsame Darstellung der Prinzipien histochemischer Reaktionen. Ein ausgezeichneter Leitfaden für den Anfänger in der Histochemie, aber auch eine wertvolle Sammlung von Methoden. Enthält zahlreiche Hinweise auf die elektronenmikroskopische Histochemie sowie einen Anhang: Verfahrensweisen und Tabellen.

H. N. Christensen:

Elektrolytstoffwechsel

Übersetzt von R. und K. Bergmann.
Mit 37 Abbildungen. 161 Seiten. 1969.
(Heidelberger Taschenbücher, Band 55)
DM 12,80; US \$ 3.60

Kurze und verständliche Darstellung biochemischer und physikalisch-chemischer Grundlagen der Homöostase in den Körperflüssigkeiten. Regulation des Säure-Basen- und des Elektrolythaushalts.

R. E. Dohrmann:

β -Glucuronidase

Mit 26 Abbildungen. 92 Seiten. 1969.
(Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik, Band 28)
Gebunden DM 36,—; US \$ 9.90

Forschungsbericht über die Eigenschaften der β -Glucuronidase unter besonderer Berücksichtigung der klinisch wichtigen Erkenntnisse. Von diagnostischem Wert z. B. ist die gesteigerte β -Glucuronidase-Aktivität des Serums bei Erkrankungen der Leber und des Pankreas sowie beim Diabetes mellitus und der Arteriosklerose. Außerdem kann die Höhe der β -Glucuronidase-Aktivität als Indikator für die Konzentration der im Organismus vorhandenen Sexualhormone dienen.

R. Gross:

Medizinische Diagnostik — Grundlagen und Praxis

Mit 12 Abbildungen und 14 Tabellen. 230 Seiten. 1969.
(Heidelberger Taschenbücher, Band 48)
DM 9,80; US \$ 2.70

Eine allgemeine Methodologie der heutigen Diagnostik mit ihren historischen, ärztlichen, medizinischen, logischen und mathematischen Elementen.

K. Kunze:

Das Sauerstoffdruckfeld im normalen und pathologisch veränderten Muskel

Untersuchungen mit einer neuen Methode zur quantitativen Erfassung der Hypoxie in situ.

Mit 67 Abbildungen. 126 Seiten. 1969.
(Schriftenreihe Neurologie/Neurology Series, Band 3)
DM 58,—; US \$ 16.00

Die Bedeutung der lokalen Sauerstoffversorgung des Muskels für eine Reihe von neuromuskulären Erkrankungen wird dargelegt. Die benutzte, neue Methodik der Sauerstoffdruckmessung wird ausführlich geschildert.

■ Bitte Prospekte anfordern!



Hitachi- Spektralphotometer 101

Hohe Leistung bei günstigem Preis.
3 Modelle für Wellenlängenbereiche
von 340–900 nm, 220–340 nm und
220–900 nm.

Optische Ausrüstung mit Gitter-
monochromator und Spezial-
Photozelle für Gesamt-Wellen-
längenbereich. Probenraum für
4 Rechteckküvetten, Sonderzubehör
für Serienmessungen.

Alleinvertretung für Deutschland:

Colora Messtechnik GmbH
7073 Lorch/Württ., Postfach 5
T (07172) 6041, FS 07-248 886

Technische Büros (Verkauf und Kundendienst):
1000 Berlin 30, Kurfürstenstraße 84, T 13 52 00
2000 Hamburg 19, Osterstraße 63, T 40 06 06, FS 02-12947
3000 Hannover, An der Tiefenriede 45, T 88 45 00
4000 Düsseldorf, Kronprinzenstr. 62, T 1 78 60, FS 08-587 253
6000 Frankfurt a.M., Röderbergweg 4-6, T 44 60 31, FS 04-11216
8000 München 2, Dachauer Straße 175, T 516 98 58

colora

**Aminosäure-
Trennungen
können Sie mit
dieser Apparatur
in 15 Minuten
ausführen**



Es ist das neue CAMAG
Hochspannungs-Elektrophorese-
System mit seinem einzigartigen
Kühlprinzip. Wollen Sie wissen,
wie das funktioniert? Sie brauchen
dazu Leitungswasser und etwas Luft,
beides haben Sie ja wohl im Hause.
An das Wasser schliessen Sie die
Zelle an, und mit der Luft ...
aber das zeigen wir Ihnen am besten
in Funktion, in Ihrem Hause.

Wenn Sie wollen, schicken wir Ihnen
unseren Prospekt, aber lieber
kommen wir zu Ihnen mit der ganzen
Ausrüstung.

Natürlich können Sie auch andere
niedermolekulare Substanzen
trennen, z. B.:
Indole, Porphyrine, Zucker, Purine,
Vitamine, anorganische Ionen.

CAMAG

Chemie-Erzeugnisse und Adsorptionstechnik AG
Homburgerstrasse 24 4132 Muttenz/Schweiz

Unser Zweigbetrieb in der Bundesrepublik:
CAMAG, 1000 Berlin 45, Baseler Strasse 65

HE-18